

NhDGK1 调控坛紫菜丝状体成熟的分子机制

陶思怡, 林颖辉, 许凯, 徐燕, 纪德华, 王文磊, 谢潮添

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 坛紫菜新品种在推广的过程中均会遇到“良种难育”的瓶颈, 即自由丝状体不容易成熟, 难以集中获得大量壳孢子, 严重制约了坛紫菜良种的推广。由于二酰甘油激酶 (*DGK*) 基因在坛紫菜丝状体成熟过程中发挥着重要作用, 因此本研究通过抑制二酰甘油激酶的活性, 发现坛紫菜孢子囊枝形成率明显降低。之后, 利用酵母双杂交技术鉴定到了7个与 *NhDGK1* 互作的蛋白质, 即电压依赖性阴离子通道蛋白 *VDAC*、葡萄糖-6-磷酸-1-差向异构酶 *G6P1E*、伴侣蛋白 *DnaJ*、细胞质蛋白复合物外被体蛋白亚基 *COP1*、肌环己六氢醇脱氢酶 *Idh*、磷酸吡哆醛合成酶 *PDX1.1* 和 3-酮脂酰-ACP 还原酶 *FabG*。这些互作蛋白广泛参与多种物质的合成与代谢、囊泡运输、光合作用和转录调控等生命过程, 当 *NhDGK1* 活性被抑制后, 这些互作蛋白编码基因的表达量同样受到抑制。其中, *G6P1E* 与 *NhDGK1* 互作提高了孢子囊枝形成过程中的糖代谢水平, 促进了藻体中碳水化合物化合物的积累; *FabG* 与 *NhDGK1* 互作可以促进脂肪酸的合成, 提高丝状体的耐受性并促进孢子囊枝的形成; *COP1* 介导的囊泡运输可能也调控了坛紫菜中 *PLC/DGK* 途径产生磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 的过程。

[关键词] 坛紫菜; 孢子囊枝; 二酰甘油激酶; 互作因子; 酵母双杂交

[中图分类号] S 963

Molecular Mechanism of *NhDGK1* Regulating the Maturation of *Conchocelis* in *Neoporphyra haitanensis*

TAO Siyi, LIN Yinghui, XU Kai, XU Yan, JI Dehua, WANG Wenlei, XIE Chaotian

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: During the promotion of new varieties of *Neoporphyra haitanensis*, there exists a “difficult breeding” bottleneck, that is, the free-living filaments are not easily matured, making it challenging to obtain a large amount of sporangial branchlets, which seriously restricts the propagation of high-quality *N. haitanensis* strains. Previous studies found that the diacylglycerol kinase gene (*DGK*) plays an important role in the maturation process of free-living filaments in *N. haitanensis*. This study found that the formation rate of sporangial branches in *N. haitanensis* was significantly reduced by inhibiting the activity of diacylglycerol kinase. Then, seven proteins interacting with *NhDGK1* were identified by yeast two-hybrid technology, namely voltage-dependent anion channel protein (*VDAC*), glucose-6-phosphate-1-epimerase (*G6P1E*), chaperone protein (*DnaJ*), coatomer delta-1 subunit (*COP1*), myo-inositol 2-dehydrogenase (*Idh*), pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit (*PDX1.1*), and 3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase (*FabG*). These interacting proteins are widely involved in various life processes such as the synthesis and metabolism of multiple substances, vesicle transport,

[收稿日期] 2025-06-23

[基金项目] 福建省自然科学基金杰出青年基金项目 (2022J06024); 国家自然科学基金项目 (32473157); 现代农业 (藻类) 产业技术体系专项项目 (CARS-50)

[通信作者] 谢潮添 (1977—), 博士, 教授, 从事坛紫菜遗传育种及生物技术研究。E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

photosynthesis, and transcriptional regulation. When the activity of *NhDGK1* was inhibited, the expression levels of the genes encoding these interacting proteins were also suppressed. Among them, the interaction between G6P1E and *NhDGK1* increases the level of sugar metabolism during the formation of sporangial branch and promotes the accumulation of carbohydrates in the algal; the interaction between FabG and *NhDGK1* can promote the synthesis of fatty acids, enhance the tolerance of filamentous bodies, and promote the formation of sporangial branches; COPI-mediated vesicle transport may also regulate the process of phosphatidic acid (PA) production through the PLC/DGK pathway in *N. haitanensis*.

Keywords: *Neoporphyra haitanensis*; sporangial branchlets; diacylglycerol kinase; interaction factors; yeast two-hybrid

0 引言

坛紫菜 (*Neoporphyra haitanensis*) 是我国海水养殖的重要品种, 在浙江、福建和广东沿海被广泛栽培, 近年也逐渐北移至江苏和山东沿海栽培。2023 年我国坛紫菜的栽培总面积约 30 000 hm², 总产量超过 16 万 t, 已经形成苗种培育、海区栽培、加工、贸易配套齐全的产业, 全产业链总产值超过 200 亿元^[1]。21 世纪以来, 先后有 5 个新品种通过了国家水产原良种审定委员会的审定^[2], 这些坛紫菜新品种在产业上的大面积推广应用, 有效提升了坛紫菜的栽培效益, 促进了坛紫菜产业的可持续发展。

紫菜生活史可以分为室内育苗的丝状体 (孢子体) 和海上栽培生产的叶状体 (配子体) 2 个阶段, 整个生长发育过程可以划分为果孢子、丝状藻丝、孢子囊枝、壳孢子形成和放散。当前, 世界上主要紫菜生产国的紫菜育苗都是以贝壳丝状体的形式在室内人工控制的条件下进行, 通过培养贝壳丝状体获得壳孢子, 采苗上网进行海区叶状体的栽培。由于紫菜生活史的特殊性, 贝壳丝状体可以采用成熟叶状体放散的果孢子进行培育 (目前紫菜育苗生产的主要方式), 也可以采用自由丝状体直接移植贝壳进行培育^[3-4]。纯系自由丝状体移植贝壳培育成熟的贝壳丝状体是当前紫菜新品种推广普遍采用的方式, 可以实现养殖种群的纯种化, 保证新品种的优良性状得以充分发挥。但由于人们对丝状体直接移植贝壳获得贝壳丝状体的成熟调控机制仍知之甚少, 育苗时无法对丝状体的生长发育进行必要的调控, 照搬果孢子采苗培育贝壳丝状体的条件, 往往难以达到预期目标。由于经常会出现壳孢子放散难、放散量小甚至不放散等问题, 严重影响了坛紫菜良种的推广应用, 这就是紫菜新品种推广中普遍存在的“良种难育”问题^[5-6]。因此, 阐明紫菜丝状体成熟的调控机制, 对于加快坛紫菜良种的推广应用, 提升坛紫菜产业的良种覆盖率, 增加栽培效益具有十分重要的意义。

目前, 对紫菜丝状体成熟调控机制的研究主要集中在其形态、生理生化 and 环境因子调控等方面, 而对其内在调控机制等基础性问题仍鲜有研究报道。为此, 本团队通过构建转录表达谱和基因权重共表达网络分析, 筛选出了调控坛紫菜丝状体成熟的关键基因——二酰甘油激酶的编码基因 *NhDGK1*^[5]。DGKs 作为磷酸肌醇信号转导途径的关键酶之一, 可以利用 ATP 催化二酰基甘油 DAG 磷酸化生成磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)。PA 是脂类信号分子中产生最快的分子, 虽然其含量甚微 (约占总磷脂的 0.6%), 但其快速积累是植物多种应激响应的早期标志^[7]。PA 除了起到信号转导的作用外, 它还是磷酸甘油酯和半乳糖脂的前体代谢物, 是植物膜形成所必需的^[7-8]。因此, DGKs 介导 PA 调控植物生长发育和胁迫应答过程, 其生物学作用和调控机制已成为植物脂类信号转导研究的重要领域。*NhDGK1* 基因在坛紫菜不同品系丝状体成熟过程中均呈上调表达, 而且在易成熟品系中上调表达的时间更早、幅度更大, 这初步说明 *NhDGK1* 参与调控了坛紫菜丝状体的成熟过程^[5]。因此, 进一步解析该基因调控坛紫菜丝状体成熟的分子机理具有重要的理论意义。

DGK 是一类保守的蛋白质家族, 根据结构域的不同, 植物 DGK 可以分为 3 类: 第 1 类 DGKs 包含 2 个典型的 DAG 结合结构域、N-末端基本结构域和 extCRD, 其中, N-末端基本结构域为植物特有的上游基础结构域, 可能和 DAG 结合结构域一起完成其生物学功能; 第 2 类和第 3 类 DGKs 结构比

较简单, 均缺少 N-端结构域^[9], 和动物中的 DGK 结构域有所区别。但这 3 种类型的 DGK 都包含 DGK 催化结构域 (DGKc) 和辅助结构域 (DGKa), DGKc 与动物中的催化结构域相同, 包含 1 个富含甘氨酸的 ATP 结合位点 Gly-X-Gly-X-X-Gly, 利用 ATP 磷酸化 DAG 为 PA, 进而调控植物生长发育和应激过程。研究表明, PhDGK1 属于 II 型 DGKs, 其序列及其启动子中存在多个功能作用位点, 以及光和植物激素响应顺式作用元件, 表明孢子囊枝形成过程中, *NhDGK1* 受光照、植物激素等因素的调控^[5]。DGKs 激酶的活性需要依赖某些蛋白质将其招募到膜结构上才能发挥作用, 不同 DGK 因其类型和结构不同导致其在细胞中的定位也大不相同。由于 DGKs 广泛分布于各个组织中, 不同的 DGKs 存在不同类型的结合蛋白。基于此, 本研究利用酵母双杂交技术鉴别 *NhDGK1* 的互作蛋白, 并进行一对一验证后, 利用抑制剂抑制 *NhDGK1* 活性, 检测其对丝状体成熟度和互作蛋白编码基因表达量的影响, 为解析坛紫菜孢子囊枝形成的分子调控机制提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

实验材料取自福建省坛紫菜种质资源库, 所选材料为双单倍体杂交群体中筛选出的 2 个坛紫菜品系 S1 (W0108-4) 和 S2 (W059-1)。

1) 坛紫菜丝状体丝状藻丝时期的藻体培养条件。水温为 $(21 \pm 0.5)^\circ\text{C}$; 光照强度为 $50 \sim 60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 光周期为 L:D = 12:12, 每 10 d 更换 1 次消毒过的丝状体培养液。

2) 坛紫菜丝状体促熟的过程。称取 0.05 g 长势良好的丝状体藻体, 加到装有 250 mL 消毒过的丝状体培养液的细胞培养瓶中, 并在瓶身做好记号, 放入培养箱中进行促熟。促熟条件: 水温为 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$; 光照强度为 $20 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 光周期为 L:D = 9:15, 每 7 d 更换 1 次消毒过的丝状体培养液, 每天摇晃瓶身 3 次。

3) 坛紫菜丝状体孢子囊枝成熟度的观察。随机挑选一个丝状体藻球, 为便于观察, 用解剖针将藻体分开, 置于载玻片上进行显微观察, 放大倍数为 200, 统计视野下孢子囊枝与丝状藻丝的藻丝数。每瓶观察 10 个藻球, 每个藻球观察 25 个视野。每 7 d 观察 1 次藻落的成熟度情况。孢子囊枝成熟度的计算公式: 成熟度 = (孢子囊枝数/总藻丝数) $\times 100\%$ 。

1.2 抑制剂浓度的确定

对藻体外源添加 4 种不同浓度 (0、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 的 DGK 抑制剂 R59022。 F_v/F_m 代表光系统 II 的最大量子产量, 可以反映藻体的生长情况。将处理后的藻体暗适应 15 min 后, 用 Diving-PAM (Walz, 德国) 测量其 F_v/F_m , 以确定合适的抑制剂浓度。

1.3 丝状体 RNA 提取和 cDNA 合成

用 70 μm 的细胞过滤器过滤丝状体, 用吸水纸吸去藻体表面多余的水分, 然后将藻体在液氮中研磨成粉末。使用 E. Z. N. A 植物 RNA 提取试剂盒 (OMEGA, 美国) 中的方法一提取坛紫菜丝状体的总 RNA。取 5 μL 总 RNA 样品加入 1 μL 6X Loading Buffer, 在质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶, 在电压为 135 V 的条件下电泳 23 min, 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪上拍照, 观察 RNA 条带的清晰度和完整性。同时取 3 μL RNA 样品在酶标仪上分别测 A(260) 和 A(280) 的值, 根据测定结果计算 RNA 的浓度, 判断核酸和蛋白质的污染情况。取检测合格的 RNA 作为模板, 取 1 μg RNA, 使用 Prime-Script™ RT reagent Kit (TaKaRa, 日本) 合成 cDNA。

1.4 实时荧光定量 PCR

按照 SYBR® Rremix Ex Taq™ II (Takara, 日本) 试剂盒使用说明, 对目的基因进行 Real-time PCR 反应。扩增程序为 95°C 30 s、 95°C 5 s、 65°C 31 s, 程序结束后, 从 55°C 缓慢升温至 95°C , 绘制溶解曲线, 用来验证引物特异性。本实验分别以 S1-0 和 S2-0 的样本作为对照, 最终数据以相对定量的形式呈现, 内参基因为坛紫菜泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, UBC)^[10]。

1.5 DGK 酶活性的测定

取 0.05 g 新鲜藻体，加入 450 μL Tris-HCl (0.05 mol/L, pH = 7.4) 到匀浆管中冰浴匀浆；4 $^{\circ}\text{C}$ 下 5000g 离心 15 min，取上清液进行测定；使用植物二酯酰甘油激酶 (DGK) 酶联免疫分析试剂盒 (江莱生物，上海) 进行藻体 DGK 酶活性的测定。

1.6 酵母双杂交文库的筛选与验证

利用本实验室前期在上海欧易生物公司构建的酵母文库，将 *PhDGK1* 全长的 PCR 产物与 BD 载体 pGBKT7 连接进行酵母双杂交文库的筛选。酵母双杂交文库的筛选参考 Wang 等^[11] 的共转法进行。对获得的互作蛋白进行点板验证时，将存在互作的质粒载体片段连接到 AD 载体 pGADT7 进行实验。首先将 *NhDGK1* 和互作的质粒载体共转入酵母菌株，然后在 SD/-Leu/-Trp 培养基中挑选阳性酵母克隆，最后在四缺 (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA (QDO/X/A)) 培养基中进行互作检验。

2 实验结果与分析

2.1 抑制剂浓度的确定

外源添加不同浓度的 DGK 抑制剂 R59022，通过测定藻体的 F_v/F_m 来确定合适的作用浓度。结果显示，50 $\mu\text{mol/L}$ 的 R59022 处理会导致藻体死亡；25 $\mu\text{mol/L}$ 的 R59022 处理会导致藻体的 F_v/F_m 值先下降后上升，最终维持在 0.45 左右 (见图 1)，表明 25 $\mu\text{mol/L}$ 是一个较为合适的长期抑制浓度。通过对丝状体成熟度 (见图 2) 的观察发现，25 $\mu\text{mol/L}$ 处理的藻体成熟受到一定的抑制。

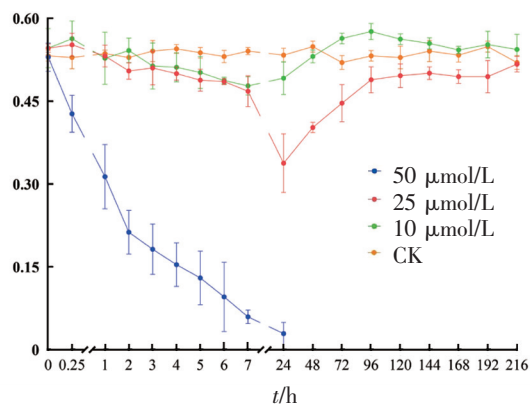


图 1 促熟 7 d 后的坛紫菜 S1 品系丝状体 F_v/F_m 在不同浓度 R59022 抑制剂处理下的变化情况

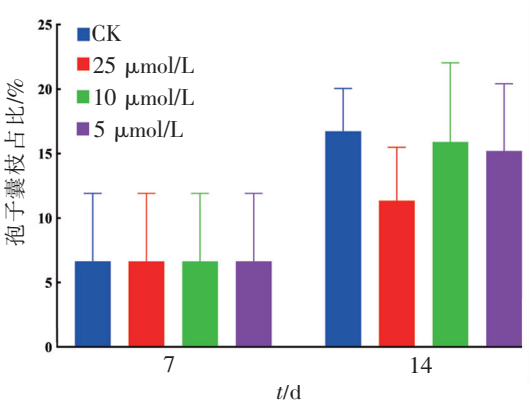


图 2 促熟 7 d 后的坛紫菜 S1 品系孢子囊枝占比在不同浓度 R59022 抑制剂处理下的变化情况

Fig.1 The changes of F_v/F_m of *Neoporphyra haitanensis* conchocelis S1 under different concentrations of R59022 inhibitor treatment after 7 d maturation

Fig.2 The changes of sporangial branchlets ratio of *Neoporphyra haitanensis* conchocelis S1 under different concentrations of R59022 inhibitor treatment after 7 d maturation

2.2 酶活性的测定

通过对促熟不同时间点坛紫菜丝状体中二酰甘油激酶的酶活性检测发现，酶活性随着成熟度的增加而增加，而抑制剂则显著抑制了促熟过程中二酰甘油激酶活性的升高，而且加入抑制剂 2 h 后，其酶活性水平即显著下降 (见图 3)。

2.3 互作蛋白的筛选

利用 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal/AbA (QDO/X/A) 高严谨度筛选平板进行筛选，共获得 40 个蓝色阳性克隆 (见图 4)。对二次筛选获得的 40 个阳性克隆菌落进行测序鉴定，得到 39 个文库质粒 pGBKT7 中插入的 cDNA 片段，通过 NCBI 对 cDNA 序列进行 Blast X 比对注释发现，15 个编码序列编码 12 种已知功能的蛋白质、21 个序列编码假设蛋白和 3 个序列未知信息 (见表 1)。15 个编码序列编码的已知功能的蛋白质包括 3 个参与细胞质和线粒体膜间物质及能量交换的电压依赖性阴离子通道蛋白 (voltage-dependent anion channel, VDAC)、2 个具有分子伴侣蛋白功能的亲环蛋白 (cyclo-

phin 1)、参与糖代谢过程中糖异构化平衡的葡萄糖-6-磷酸-1-差向异构酶 (glucose-6-phosphate 1-epimerase, G6P1E)、含有 C2 结构域的 SRC2-like protein、参与氨基酸代谢的 5-甲基四氢蝶酰三谷氨酸-同型半胱氨酸 S-甲基转移酶 (homocysteine methyltransferase)、具有分子伴侣功能的小分子热激蛋白 DnaJ、基础转录因子 Basic transcription factor、参与囊泡运输的细胞质蛋白复合物外被体蛋白亚基 (coatomer subunit delta-1, COP1)、肌环己六氢醇脱氢酶 (myo-inositol 2-dehydrogenase, Idh)、参与维生素 B6 合成的磷酸吡哆醛合成酶 (pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit, PDX1.1)、脂肪酸延伸相关酶 3-酮脂酰-ACP 还原酶 (3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase, FabG) 和藻胆体连接蛋白 phycobilisome 31.8 ku linker。通过蛋白互作筛选可见, *NhDGK1* 广泛参与氨基酸代谢、糖代谢、维生素合成、脂肪酸延伸、能量代谢等多种植物生命体过程。

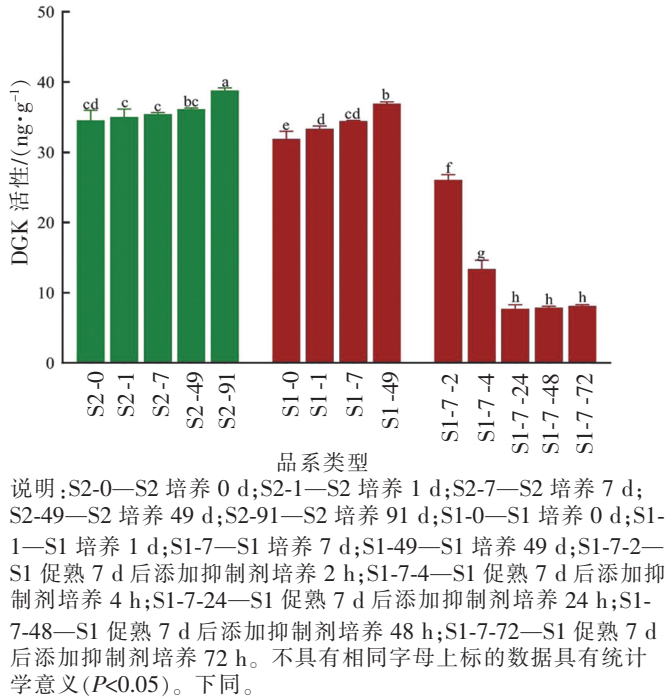


图 3 不同促熟时间点坛紫菜丝状体 DGK 酶活性变化情况
Fig.3 The changes of DGK activity of *Neoporphyra haitanensis* conchocelis at different maturation treatment time points

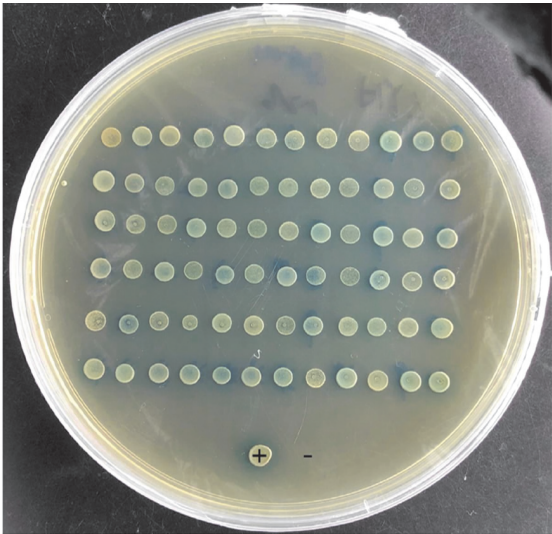


图 4 高严谨度筛选平板的阳性克隆 (QDO/X/A)
Fig.4 High accuracy screening (QDO/X/A) for positive clones on the plate

表 1 *NhDGK1* 蛋白互作筛选库结果

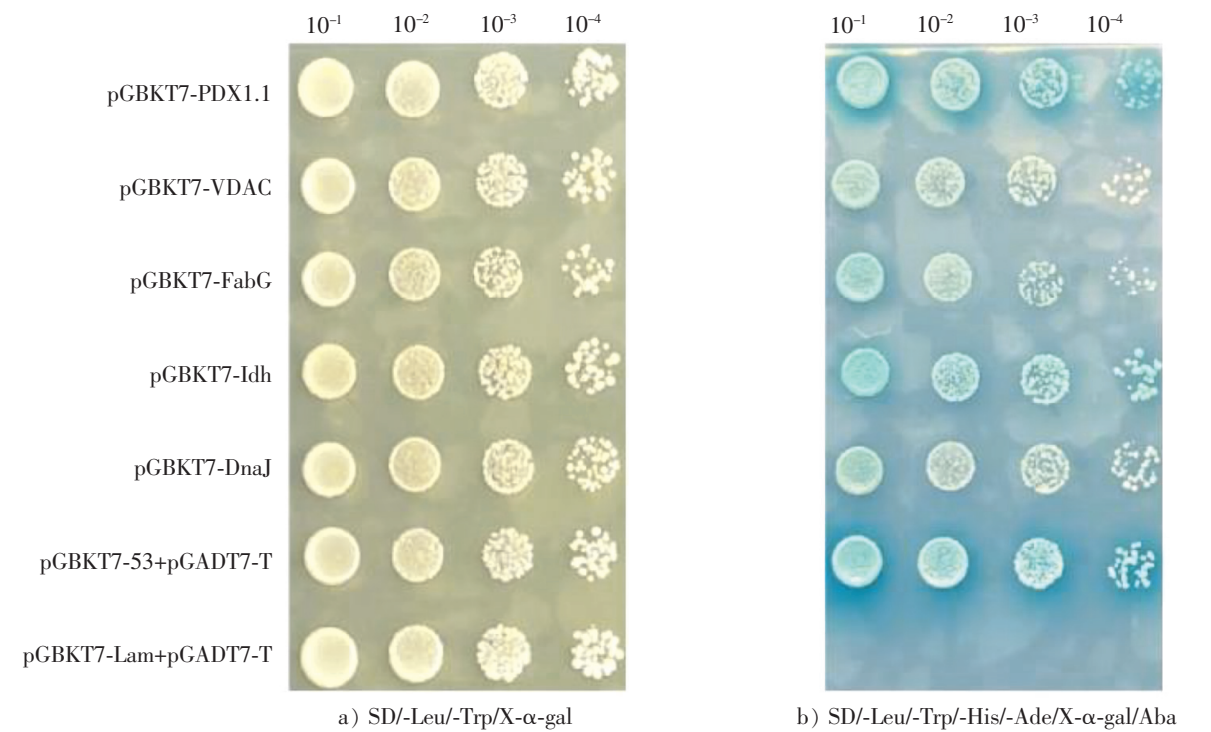
Tab. 1 Library screening results of *NhDGK1* protein interaction proteins

蛋白质类型	基因库	功能注释	物种来源	拷贝数
已知功能蛋白	OSX73919.1	voltage-dependent anion channel	<i>Galdieria sulphuraria</i>	3
	AFG29854.1	cyclophilin 1	<i>Pyropia haitanensis</i>	2
	XP_024928610.1	glucose-6-phosphate 1-epimerase	<i>Ziziphus jujuba</i>	1
	XP_015900043.1	SRC2-like protein	<i>Ziziphus jujuba</i>	1
	XP_015899792.1	homocysteine methyltransferase	<i>Ziziphus jujuba</i>	1
	OSX81340.1	basic transcription factor 3	<i>Gracilariopsis chorda</i>	1
	OSX81100.1	chaperone protein DnaJ	<i>Gracilariopsis chorda</i>	1
	OSX78354.1	coatomer subunit delta-1	<i>Gracilariopsis chorda</i>	1
	OSX81084.1	myo-inositol 2-dehydrogenase	<i>Galdieria sulphuraria</i>	1
	OSX75064.1	pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit	<i>Porphyridium purpureum</i>	1
	OSX71714.1	3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase	<i>Porphyridium purpureum</i>	1
	OSX71412.1	phycobilisome 31.8 ku linker	<i>Porphyridium purpureum</i>	1

续表

蛋白质类型	基因库	功能注释	物种来源	拷贝数
未知功能蛋白	OSX69271.1	hypothetical protein BU14_1996s0001	<i>Porphyra umbilicalis</i>	9
	OSX69420.1	hypothetical protein BU14_1527s0001	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX69693.1	hypothetical protein BU14_1265s0003	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX80344.1	hypothetical protein BU14_0053s0010	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX75132.1	hypothetical protein BU14_0254s0012	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX69226.1	hypothetical protein BU14_1721s0002	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX69064.1	hypothetical protein BU14_1909s0002	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX68333.1	hypothetical protein BU14_2984s0001	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX79428.1	hypothetical protein BU14_0077s0049	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX81532.1	hypothetical protein BU14_0014s0082	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX69169.1	hypothetical protein BU14_1777s0001	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	OSX74347.1	hypothetical protein BU14_0293s0018	<i>Porphyra umbilicalis</i>	1
	PXF47265.1	hypothetical protein BWQ96_03040	<i>Gracilariopsis chorda</i>	1
	Unknown	unknown	unknown	3

从 15 对互作菌落中挑选阳性克隆菌落进行质粒提取，并分别与 pGBKT7-NhDGK1 质粒进行共转化酵母，并在 QDO/X/A 培养基上进行进一步的一对一验证。除去假阳性，共获得 8 对存在一对一互作关系的蛋白质。再次对这 8 对互作蛋白进行回转点板验证（见图 5），最终筛选到的 7 对互作蛋白为 NhPDX1.1、NhVDAC、NhFabG、NhIdh、NhDnaJ、NhG6PIE 和 NhCOP1。



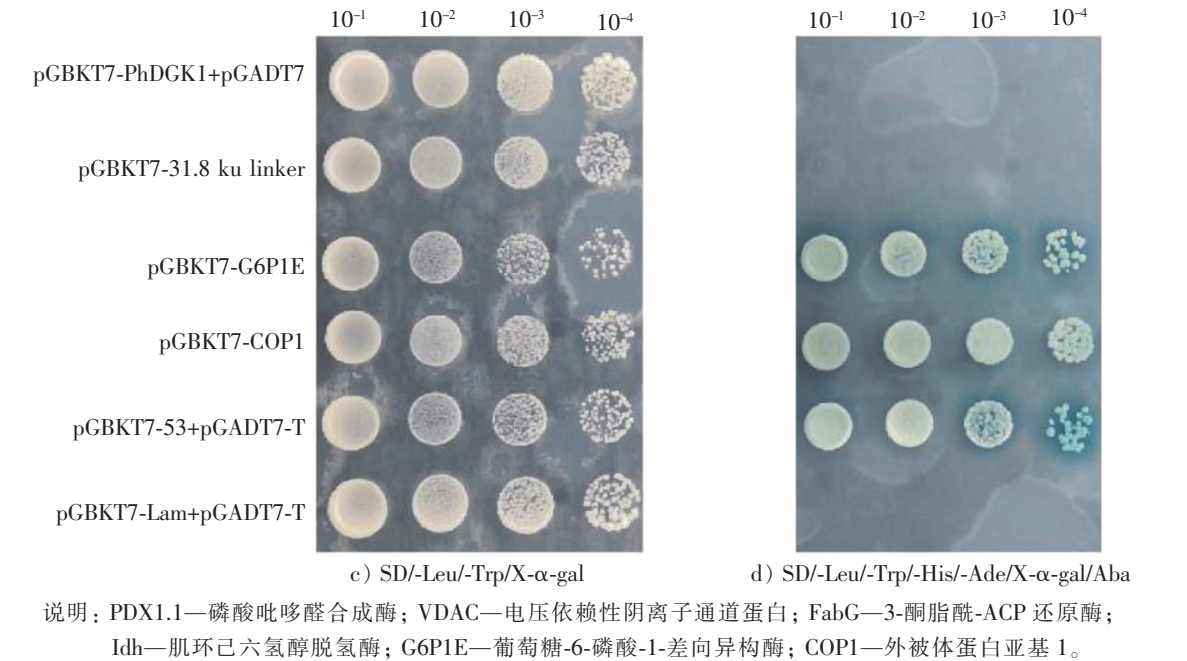
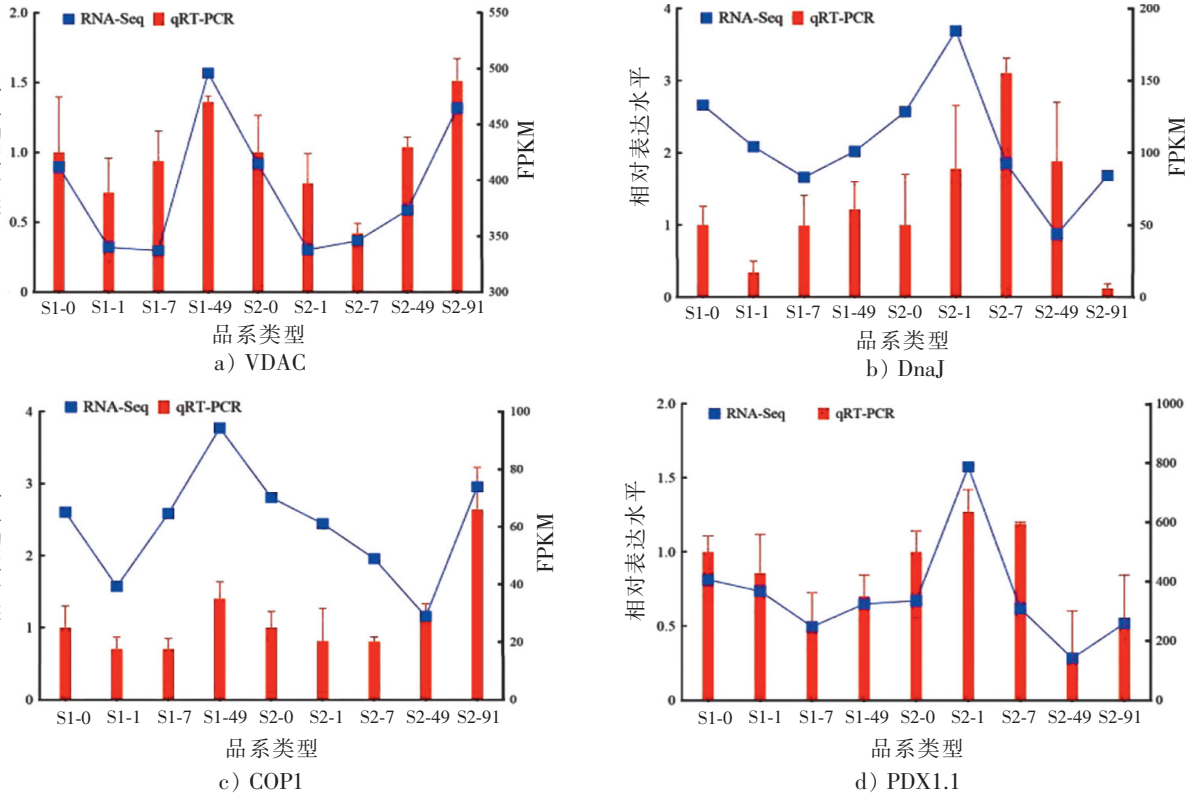


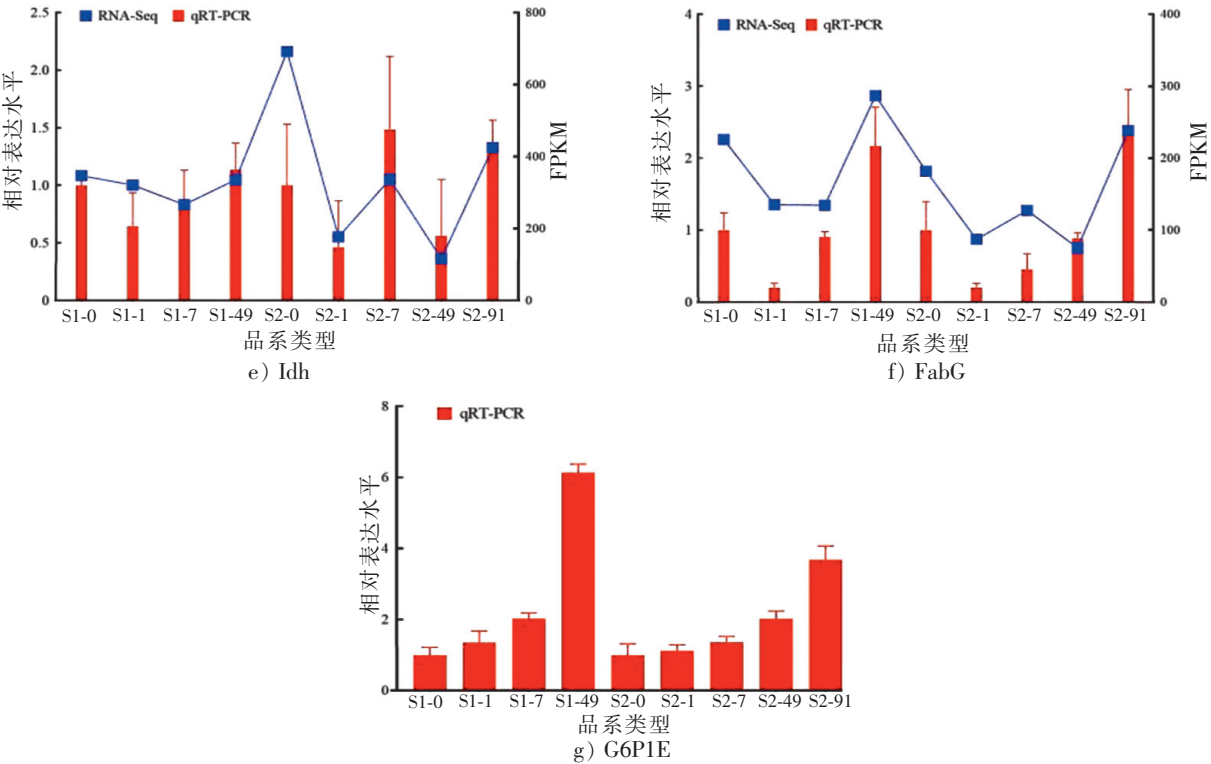
图 5 利用酵母双杂交对 *NhDGK1* 互作蛋白进行一对一验证

Fig.5 One-to-one validation of the interacting proteins of *NhDGK1* conducted using the yeast two-hybrid system

2.4 基因表达水平的检测

6 条互作蛋白编码基因的转录表达谱差异和定量结果显示, *NhVDAC*、*NhCOP1* 和 *NhFabG* 均呈现先下降表达后水平上升的趋势, 而 *NhG6P1E* 则持续上调表达 (见图 6)。同时, 在抑制剂处理下, *NhVDAC*、*NhCOP1*、*NhIdh* 等 7 个基因的表达水平同样受到了抑制, 但在抑制 24 h 后, 不同基因间的表达模式各不相同, 但总体的表达趋势与 *NhDGK1* 的表达模式一致 (见图 7)。

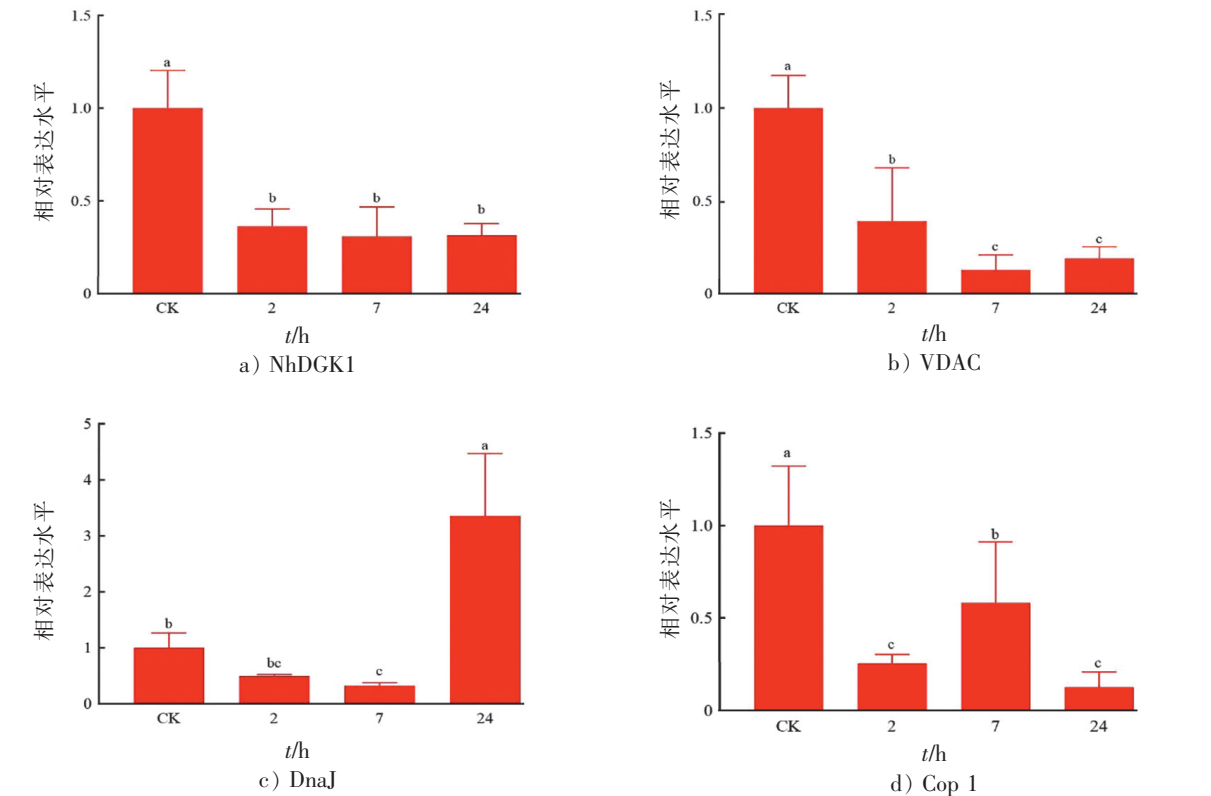




说明:RNA-Seq 数据来源于文献[5]。FPKM 为每千个碱基转录每百万映射读取的片段数。

图 6 NhDGK1 互作蛋白编码基因表达水平检测

Fig.6 The expression levels of the encoding genes for the interacting proteins with NhDGK1



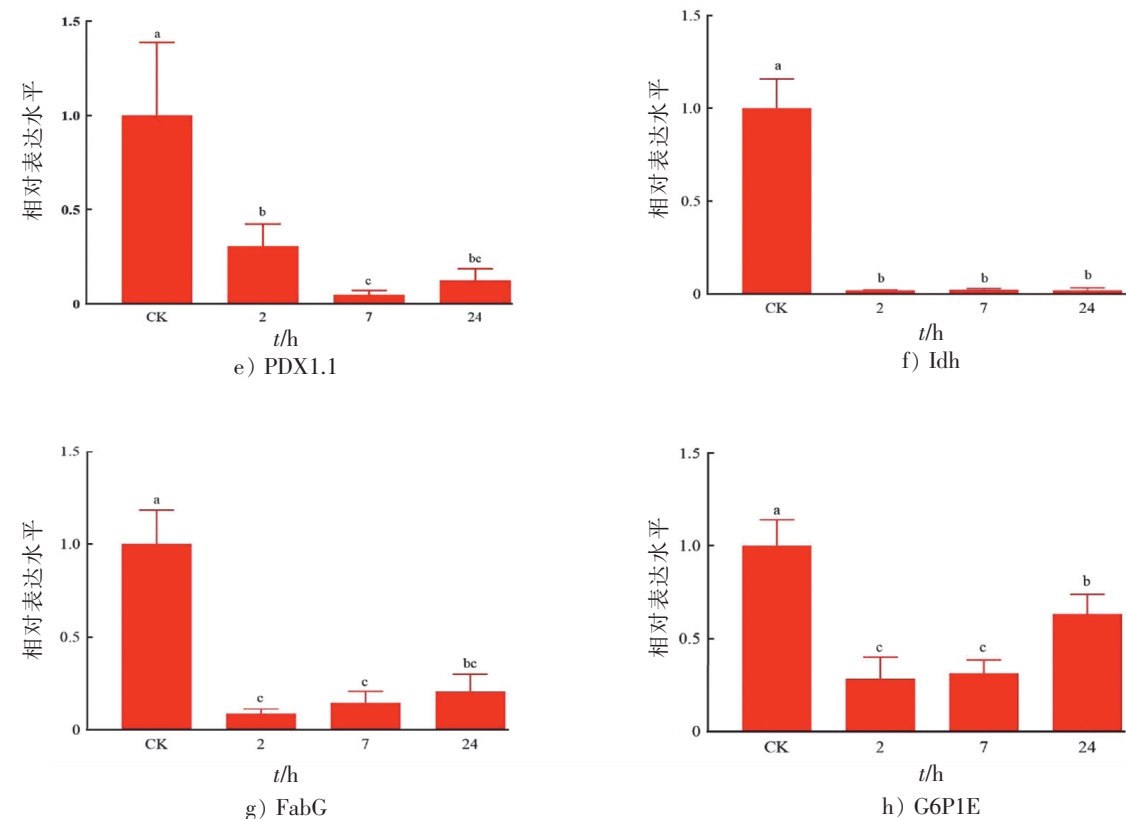


图 7 R59022 处理下 *NhDGK1* 互作蛋白编码基因表达水平检测

Fig.7 The expression of the encoding genes for the interacting proteins with *NhDGK1* in R59022 inhibitor treatment

3 讨论

PLC/DGK 途径是植物体产生 PA 分子的主要途径之一, DGK 通过磷酸化 DAG 生成 PA, 调节细胞内脂质的丰度并维持脂质稳态^[12]。DGK 的活性受 pH 值、去污剂和抑制剂的影响, 其中 DGK 抑制剂 R59022 可以与 DGK 上的 ATP 结合位点竞争结合 ATP, 进而抑制 DGK 的磷酸化水平, 提高细胞中 DAG 的含量, 同时降低 PA 的含量。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的研究中表明, DGK 磷酸化产生的 PA 可以促进植株根系的生长, 而在 R59022 处理下, 拟南芥根部细胞中的 PA 含量减少, 根系生长也受到了抑制^[13]。同时, Gomez-Merino 等研究结果也表明, 适当浓度的 R59022 不仅可以抑制拟南芥中 AtDGK2 和 AtDGK7 的酶活性, 同时也影响幼苗根系的发育^[14]。R59022 还抑制条斑紫菜 (*Neopyropia yezoensis*) 单孢子萌发过程中的极性生长和细胞分裂, 最终导致细胞畸形^[15]。在本研究中, 坛紫菜丝状体中的 DGK 酶活同样受 R59022 抑制, 而 DGK 酶活性的下降也影响了丝状体的成熟度。同时, *NhDGK1* 在坛紫菜孢子囊枝成熟后期显著上调表达, 且在 R59022 处理下, *NhDGK1* 表达水平和丝状体成熟度均受到影响。这表明, *NhDGK1* 通过 PLC/DGK 途径生成 PA 是坛紫菜孢子囊枝形成的关键过程之一。同时, 相较于晚成熟的 S2 品系, S1 品系可以更早激活 *NhDGK1* 的表达, 更快地合成 PA, 进而促进孢子囊枝的快速形成。这再次说明 DGK 参与了坛紫菜孢子囊枝的形成。

本研究利用酵母双杂交技术共鉴定到 7 个与 *NhDGK1* 存在互作的蛋白质, 这表明 *NhDGK1* 在坛紫菜体内可能存在多种调控方式。在互作分子中, G6P1E 处于葡萄糖糖代谢途径的分支点, 催化 α -D-葡萄糖-6-磷酸异构化生成 β -D-葡萄糖-6-磷酸, 生成的 β -D-葡萄糖-6-磷酸会被继续催化参与糖酵解/糖异生等糖代谢途径。前期转录组和代谢组的数据表明, 在促熟过程中, 藻体通过提高糖酵解途径促进色素蛋白、碳水化合物的合成, 以及中间代谢产物的形成, 进而促进孢子囊枝的形成^[5]。此外, G6P1E 还可以催化多种己糖-6-磷酸 (葡萄糖-6-磷酸、半乳糖-6-磷酸和甘露糖-6-磷酸等) 从 α 到 β 的

相互转化^[16]。研究发现, G6P1E 参与了石竹 (*Dianthus chinensis*) 的糖代谢过程, 抑制 G6P1E 酶的活性可以降低植物体内的糖含量, 同时显著抑制花蕾的正常发育及花色的形成^[17]。在坛紫菜孢子囊枝成熟过程中, 藻体中的总糖和寡糖含量增多^[5], 同时 *NhG6P1E* 的表达也随着成熟度的增加而上升, 这表明 *NhDGK1* 与 G6P1E 互作可能参与调节丝状体成熟过程中的糖含量变化。

COP1 是参与细胞内关键的囊泡逆向转运蛋白, 其介导的囊泡逆向运输不仅可以维持内质网和高尔基体结构与形态, 还参与调节细胞脂质代谢等过程。布雷菲德菌素 A (Brefeldin-A ADP-ribosylated substrate, BARS) 是 COP1 囊泡小体形成与裂变过程中的关键因素, 而 PA 可以协同 BARS 诱导 COP1 囊泡形成过程中的脂质体管状化, 调节囊泡的膜曲率变化, 参与 COP1 囊泡复合物的形成^[18]。但参与上述调节过程的 PA 由 PLD 介导产生。同样, 通过 PLD 途径产生的 PA 分子是条斑紫菜生殖细胞成熟过程中所必需的信号分子, 并参与了藻体的囊泡运输与细胞壁的组分变化^[19]。本研究结果显示, *NhDGK1* 和 *NhCOP1* 存在互作关系, 二者的表达模式具有一致性, 且 *NhCOP1* 的表达受到 *NhDGK1* 抑制剂的调控。因此, 紫菜中 COP1 蛋白介导的囊泡运输可能也与 PLC/DGK 途径产生的 PA 有关, 其具体作用机制值得进一步验证。

FabG 是合成脂肪酰-ACP 的关键还原酶, 可以为棕榈酸和硬脂酸的合成提供底物。例如, 文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) 的 FabG 的基因在果仁形成期间持续上调表达, 为果仁中中链脂肪酸合成提供了充足的底物^[20]。FabG 的缺失使得水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 叶片中的亚麻酸含量显著降低, 而过表达 FabG 不仅增加了植株亚麻酸的含量, 还改变植株的耐热性^[21]。藻体中脂肪酸类物质的改变可以调节坛紫菜在逆境下的生存与生长^[22-23]。同时, 本研究前期研究结果显示, 脂肪酸在坛紫菜孢子囊枝形成过程中发挥着重要作用^[5]。虽然目前未见 FabG-DGK 互作的相关报道, 但 FabG-DGK 在调节 PA 合成过程中同样发挥着重要的作用。

4 结论

本研究发现, DGK 抑制剂 R59022 可以抑制坛紫菜 *NhDGK1* 的表达及其酶活性水平, 进而抑制孢子囊枝的形成, 表明 PLC/DGK 途径对坛紫菜孢子囊枝形成至关重要。利用酵母双杂交技术鉴定到了 7 个与 *NhDGK1* 互作的蛋白质, 这些互作蛋白广泛参与糖类和脂质多种物质的合成与代谢、囊泡运输、光合作用和转录调控等生命过程, 研究结果为解析 *NhDGK1* 调控坛紫菜丝状体成熟的分子机制提供了理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.
- [2] 王文磊, 徐燕, 纪德华, 等. 大型海藻育种技术研究进展及其应用[J]. 水产学报, 2023, 47(11): 44-57.
- [3] 何培民, 张泽宇, 张学成, 等. 海藻栽培学[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
- [4] 谢潮添, 陆勤勤. 紫菜绿色高效养殖技术与实例[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- [5] LIN Y H, XU K, XU Y, et al. Transcriptome co-expression network analysis identifies key genes regulating conchosporangia maturation of *Pyropia haitanensis*[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 680120.
- [6] NIE Y S, XU Y, LIN Y H, et al. Characteristics of N6-methyladenosine modifications during the maturation of free-living conchocelis of *Pyropia haitanensis*[J]. Aquaculture, 2025, 599: 742198.
- [7] ANGKAWIJAYA A E, NGUYEN V C, GUNAWAN F, et al. A pair of arabidopsis diacylglycerol kinases essential for gametogenesis and endoplasmic reticulum phospholipid metabolism in leaves and flowers[J]. Plant Cell, 2020, 32(8): 2602-2620.
- [8] KUE FOKA I C, KETEHOU LI T, ZHOU Y, et al. The emerging roles of diacylglycerol kinase (DGK) in plant stress tolerance, growth, and development[J]. Agronomy, 2020, 10(9): 1375.
- [9] GÓMEZ-MERINO F C, BREARLEY C A, ORNATOWSKAM, et al. AtDGK2, a novel diacylglycerol kinase from *Arabidopsis*

- thaliana*, phosphorylates 1-stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol and exhibits cold-inducible gene expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(9): 8230-8241.
- [10] LI B, CHEN C S, XU Y, et al. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying the gene expression in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) by quantitative real-time PCR[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 33: 152-159.
- [11] WANG W L, LIN J Z, CHANG J, et al. A RING type ubiquitin ligase PhCUL4 is involved in thermotolerance of *Pyropia haitanensis*[J]. *Algal Research*, 2021, 59: 102448.
- [12] ARISZ S A, TESTERINK C, MUNNIK T. Plant PA signaling via diacylglycerol kinase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1791(9): 869-875.
- [13] PETERS C, LI M, NARASIMHAN R, et al. Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(8): 2642-2659.
- [14] G6MEZ-MERINO F, ARANA-CEBALLOS F A, TREJO-T6LLEZ L, et al. Arabidopsis AtDGK7, the smallest member of plant diacylglycerol kinases (DGKs), displays unique biochemical features and saturates at low substrate concentration[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(41): 34888-34899.
- [15] LI L, SAGA N, MIKAMI K. Ca^{2+} influx and phosphoinositide signalling are essential for the establishment and maintenance of cell polarity in monospores from the red alga *Porphyra yezoensis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(12): 3477-3489.
- [16] GRAILLE M, BALTAZE J P, LEULLIOT N, et al. Structure-based functional annotation: yeast ymr099c codes for a D-hexose-6-phosphate mutarotase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(40): 30175-30185.
- [17] 高亚南. 中国石竹中葡萄糖-6-磷酸-1-差向异构酶基因的功能鉴定及表达分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [18] YANG J S, GAD H, LEE S Y, et al. A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into golgi maintenance[J]. *Nature Cell Biology*, 2008, 10(10): 1146-1153.
- [19] UJI T, KANDORI T, KONISHI S, et al. Phospholipase D activation is required for 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid signaling during sexual reproduction in the marine red alga *Neopyropia yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 1-12.
- [20] 刘淩悦, 阮成江, 王莉, 等. 文冠果种仁油脂脂肪酸形成的多基因协同调控[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(6): 1834-1842.
- [21] 杨佩. 水稻 β -酮脂酰 ACP 还原酶的克隆及功能初探[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [22] WEN J, SHI J Z, MENG M H, et al. Metabolic responses of *Pyropia haitanensis* to dehydration-rehydration cycles revealed by metabolomics[J]. *Marine Drugs*, 2025, 23(5): 203.
- [23] XU N N, XU K, XU Y, et al. Interactions between nitrogen and phosphorus modulate the food quality of the marine crop *Pyropia haitanensis* (T. J. Chang & B. F. Zheng) *N. Kikuchi* & *M. Miyata* (*Porphyra haitanensis*) [J]. *Food Chemistry*, 2024, 448: 138973.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)